

Sistema imunológico em aracnídeos

Pedro Ismael da Silva Junior¹

¹Biólogo, Ph.D. Ciências Biológicas, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada - Instituto Butantan - Av. Vital Brazil, 1500 – São Paulo, Brasil. pisjr@butantan.gov.br

Resumo. Aracnídeos, como todos os invertebrados, estão constantemente expostos a infecções microbianas, e para proteger-se tem desenvolvido poderosos mecanismos de defesa imune semelhante àqueles do sistema imune inato dos vertebrados. Esses mecanismos envolvem respostas celulares e humorais. A resposta imune compreende fagocitose, nodulação e encapsulação dos invasores, a regulação da hemocianina/fenoloxidase para produzir melanina que destrói os patógenos, uma cascata de coagulação para impedir a perda de hemolinfa e imobilizar os invasores e uma produção constitutiva de peptídeos antimicrobianos. Apesar de sua diversidade na sequência de aminoácidos e estrutura, eles compartilham algumas características comuns, tais como um tamanho pequeno (<10 kDa), bem como características catiônicas e anfipáticas. Baseando-se nas características estruturais e composição de aminoácidos, PAMs podem ser agrupados em três classes: (1) PAMs lineares em alfa-hélice e anfipáticos, (2) PAMs com cisteínas e cíclicos ou cíclicos com terminação, e (3) PAMs apresentando uma maior quantidade de um aminoácido em particular. Dependendo do organismo, os PAMs são produzidos constitutivamente e estocados em células secretoras, ou sua síntese é induzida após uma infecção. Na maioria dos insetos, os PAMs têm sua síntese iniciada poucas horas após uma infecção ter ocorrido. Em outros invertebrados, como os caranguejos em forma de ferradura (horseshoe crabs), mexilhões, camarões e aracnídeos, os PAMs são produzidos constitutivamente e armazenados em granulócitos. Até o momento, o sistema imune de aracnídeos tem sido mais bem investigado na aranha *Acanthoscurria gomesiana*. A partir de hemócitos dessa aranha, dois diferentes PAMs foram isolados, gomesina e acanthoscurrina. Ambos são produzidos constitutivamente e estocados nos grânulos dos hemócitos, dos quais são liberados na hemolinfa após uma infecção. Gomesina é um pequeno peptídeo de 18 aminoácidos com duas pontes dissulfeto adotando uma estrutura de grampo e com atividade contra bactérias e fungos. Acanthoscurrina são peptídeos lineares de 10kDa, ricos em glicina e com atividade contra bactérias Gram-negativas e leveduras. Foram isolados e caracterizados recentemente, em hemócitos da aranha *Cupiennius salei*, as ctenidinas. Semelhante às Acanthoscurrinas, foram observadas três isoformas de ctenidinas ricas em glicina. Do plasma da aranha *A. gomesiana* foi isolado um peptídeo antimicrobiano (Rondonina), um fragmento de hemocianina, apresentando atividade antifúngica. Nos últimos anos, PAMs similares têm sido encontrados em outros aracnídeos: carrapatos, opiliões, amblipígio, telifonídeos e escorpiões.

Palavras chaves: Aracnídeos, peptídeos antimicrobianos, gomesina, acanthoscurrina, rondonina.

Summary. Invertebrates are constantly exposed to microbial infections, and to protect themselves they have developed powerful immune defense mechanisms similar to those innate to vertebrates. These mechanisms involve cellular and humoral responses. The immune response comprises phagocytosis, nodulation and encapsulation of invaders, the regulation of hemocyanin/phenoloxidase to produce melanin which destroys pathogens, a clotting cascade to stop hemolymph loss and immobilize invaders and the constitutive production of antimicrobial peptides. Despite their diversity in sequence and structure, they share some common features, such as small size (<10 kDa), as well as cationic and amphipathic properties. Based on structural features and amino acid composition, AMPs are usually grouped into three main classes: (1) linear amphipathic, α -helical AMPs, (2) cyclic or open ended cyclic AMPs containing cysteine, and (3) AMPs with an overrepresentation of particular amino acids. Depending on the organism, AMPs are either constitutively stored within secretory cells, or their synthesis is induced at the time of infection. In most insects, AMP synthesis starts a few hours after an infection has occurred. In other invertebrates, such as horseshoe crabs, mussels, and shrimps, AMPs are constitutively produced and stored in hemocyte granules. Until now, the immune system of arachnids has been well investigated mainly on the spider *Acanthoscurria gomesiana*. From naive hemocytes of this spider, two different AMPs were isolated, gomesin and acanthoscurrins. Both are produced constitutively and stored in granules of hemocytes, from which they can be released into the hemolymph upon infection. Gomesin is a small, 18-residue AMP forming two disulphide bridges and adopting a β -hairpin-like structure active against bacteria and fungi. Acanthoscurrins are glycine-rich AMP active against Gram-negative bacteria and yeast. Similarly, ctenidins, three isoforms of a glycine-rich peptide family, was isolated and characterized of hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. Rondonin, a hemocyanin fragment had been observed showing antimicrobial activity in the hemolymph of *A. gomesiana*. In recent years, similar AMPs has been found in others arachnids: ticks, harvestmen, whip spiders, whip scorpion, vinegaroons and scorpions.

Key words: Arachnids, antimicrobial peptides, gomesin, acanthoscurrin, rondonin.

Introdução

Os artrópodes constituem o grupo mais numeroso do Reino Animal, estimando-se que cheguem a alcançar mais de um milhão de espécies. A sua distribuição geográfica é muito ampla devido à grande capacidade adaptativa, reprodutiva e de defesa contra os predadores, estando presente

em todos os ecossistemas e habitats (RUPPERT e BARNES, 2005). Estes animais surgiram no início do Cambriano, e sofreram poucas alterações durante a evolução. No entanto, estão bem adaptados a ambientes inóspitos, com alta presença de microrganismos e parasitas patogênicos. Tais características podem demonstrar que uma das razões do sucesso deste filo seja a capacidade de se defender contra esses patógenos, possuindo um eficiente sistema imunológico (RUPPERT e BARNES, 2005; BARRAVIERA, 1994). É, portanto, claro que os invertebrados devam ter meios eficientes de reconhecer e combater microrganismos potencialmente perigosos.

Aracnídeos

O sistema de defesa dos aracnídeos, assim como nos invertebrados em geral se distingue fundamentalmente daquele dos vertebrados pela ausência de uma memória imunológica e pela falta de imunoglobulinas, moléculas que apresentam alta especificidade contra os invasores. A resposta de defesa dos invertebrados é muito pouco específica e se apoia sobre um sistema de defesa complexo que envolve reações celulares e humorais coordenadas. A hemolinfa nesses organismos, como em todos os artrópodes, desempenha um importante papel. Pode ser considerada como um órgão multifuncional, central para locomoção (Kropf 2013), respiração (Burmester 2013) e nutrição. Na ocorrência de alguma lesão, ocorre não somente a perda imediata de fluido, mas também o ataque de patógenos e assim infecções. Portanto os aracnídeos têm que reagir a injúria impedindo a perda de hemolinfa e também contendo a infecção. Isto é conseguido por um sistema imune inato que envolve vários sistemas de defesa tais como tais como a coagulação da hemolinfa e a produção de uma variedade de substâncias defensivas (Fukuzawa *et al.* 2008). Em aranhas, o sistema imunitário está localizado nos hemócitos, que são derivados a partir de células do miocárdio da parede do coração, onde eles são produzidos como prohemócitos e a partir de onde elas são libertadas como diferentes tipos de células na hemolinfa (Seitz 1972). Eles contribuem para a defesa contra patógenos por fagocitose, nodulação e encapsulamento dos invasores. A resposta humoral inclui mecanismos, que induzem a produção de melanina à destruição de agentes patogênicos, uma cascata de coagulação para parar perda hemolinfa e a produção constitutiva de vários tipos de peptídeos antimicrobianos, que são armazenados em grânulos nos hemócitos e liberado na hemolinfa (Fukuzawa *et al.* 2008).

Hemócitos

Seitz (1972) mostrou que em *Cupiennius salei* (Ctenidae), os hemócitos são formados na parede do coração da aranha, mas não reconheceu a sua função imunológica. Sherman (1973) analisando os hemócitos de *Aphonopelma marxi* (Theraphosidae) percebeu o contexto para a defesa imunológica e de coagulação. Ele também revisou a nomenclatura confusa de células sanguíneas (Sherman 1981) e distinguiu três tipos de hemócitos maduros e um tipo de célula precursora.

- Os granulócitos que contêm vários peptídeos antimicrobianos liberados na hemolinfa durante a desgranulação, para matar agentes patogênicos. Também eliminar os invasores através de fagocitose (Fukuzawa *et al.* 2008).
- Os plasmatócitos, não possuem inclusões granulares, ou seja, o seu citoplasma é geralmente agranular ou finamente granulado e estão envolvidos na fagocitose de agentes patogênicos e na coagulação (Sherman 1981).
- Cyanocytes correspondem a oenocytes (Sherman, 1981). Eles são raros na hemolinfa (<5% de acordo com Millot 1949), mas são freqüentemente encontrados no coração (Sherman 1973). O citoplasma é denso e contém muitos ribossomos e cristais de hemocianina. São responsáveis pela síntese da hemocianina que é liberada na hemolinfa (Kemper 1983).
- prohemócitos são células pequenas, principalmente redondas com um grande núcleo compacto e fino citoplasma homogêneo. Como as células precursoras dos outros hemócitos, são células-tronco (Sherman 1981) e encontram-se principalmente na parede do coração (Seitz 1972; Fukuzawa *et al.* 2008).

Cascata da Fenoloxidase

Quando ocorre uma lesão na cutícula, os hemócitos migram para esse local porta de uma possível infecção. Eles atuam diretamente contra os patógenos por fagocitose, a formação de nódulos onde são aprisionadas as bactérias (Nodulação), e pela formação de cápsulas para prender objetos maiores (encapsulamento de parasitas) provocando a morte destes por asfixia ou por ação de substâncias tóxicas que são liberadas pelos hemócitos dentro dos nódulos ou cápsulas (Fig. 1). É muito comum a melanização desses nódulos e cápsulas para o isolamento dos parasitas. A reação de melanização, que é uma resposta comum à invasão de parasitas nos invertebrados, principalmente nos artrópodes, é devida a atividade da fenoloxidase. Esta enzima é parte de um complexo sistema de proteases, proteínas de reconhecimento e inibidores de proteases, constituindo o conhecido sistema ativador da pro-fenoloxidase (Fig. 2). É um sistema de reconhecimento “nonsel” porque a conversão de pró-fenoloxidase na enzima ativa pode ser desencadeada por minúsculas quantidades de lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e β -1, 3-glucanos característicos dos microrganismos (Söderhäll & Cerenius, 1998).

Coagulação

Ao lado da ativação da pró-fenoloxidase que é desencadeada imediatamente após um ferimento ou penetração de algum organismo invasor, outra reação que muitas vezes ocorre, é a coagulação da hemolinfa. Esse fenômeno vem sendo pouco estudado em insetos, no entanto em *Limulus* (Chelicerata) é conhecido que a coagulação é ativada por uma cascata de serino-proteases,

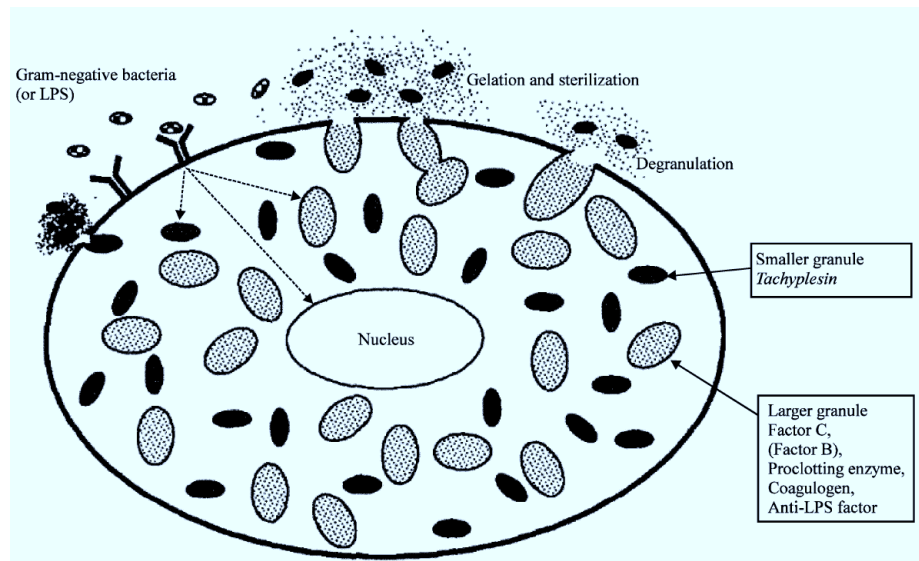


Figura 1 – A figura ilustra como os hemócitos agem contra microrganismos invasores. A endotoxina bacteriana (lipopolisacarídeo (LPS)) ao primeiro contato com uma proteína receptora/ligante de LPS, que está provavelmente localizada na membrana plasmática da célula. Através desse contato, algumas reações celulares são desencadeadas induzindo a fusão de grânulos à membrana plasmática, resultando na dispersão dos componentes dos grânulos grandes no plasma. Esta exocitose ativa o sistema intracelular de coagulação e o coágulo gerado durante a ativação imobiliza os agentes invasores. Peptídeos antimicrobianos e fatores anti-LPS são liberados de grânulos menores e grânulos maiores, respectivamente, agindo como substâncias bactericidas (John *et al.*, 2010).

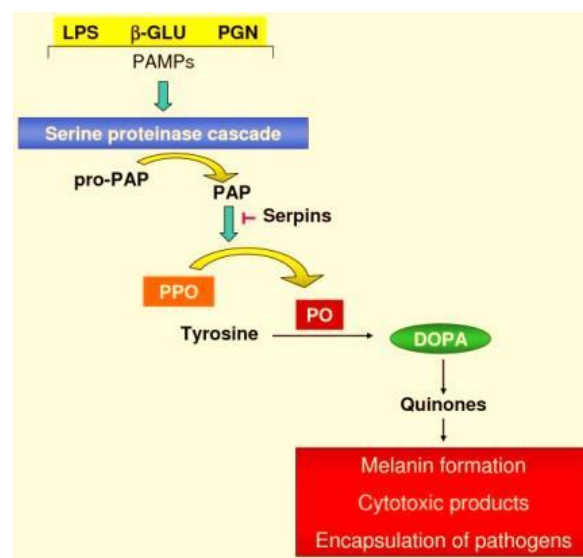


Figura 2 – Uma cascata de serino protease é ativada quando diferentes receptores reconhecem modelos moleculares associados a patógenos. Essas serino proteases hidrolisam e ativam precursores de proteases ativadoras de “prophenoloxidase” (proPAP) em proteases ativadoras de “prophenoloxidase” (PAP) que podem ser inibidas por serpinas (inibidores de proteases). A enzima PAP hidrolisa a “prophenoloxidase” (PPO) liberando a “phenoloxidase” (PO). PO oxida a tyrosina para “dihydroxyphenylalanine” (DOPA) e subsequentemente para quinona, precursor de melanina, produtos citotóxicos e a encapsulação.

semelhante aquela da pró-fenoloxidase (Fig. 3). Todos os componentes da reação de coagulação de *Limulus* já foram caracterizados a nível molecular (Iwanaga *et al.* 1998). Essas proteases possuem funções homólogas aos componentes do sistema de complemento e aos fatores de coagulação dos mamíferos. Essas informações sugerem que todas essas cascatas proteolíticas podem ter uma origem comum (Iwanaga *et al.* 1998).

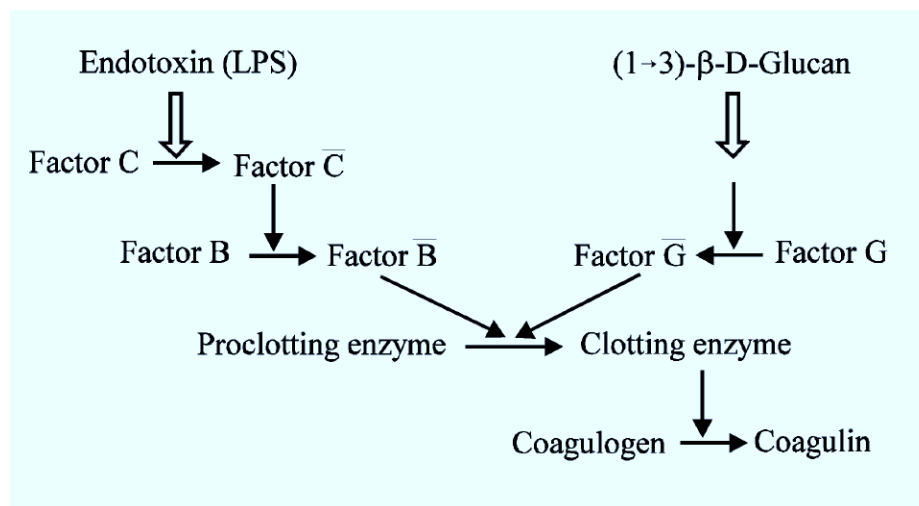


Figura 3 – Cascata de coagulação da hemolinfa de *Tachypleus tridentatus*. Uma cascata de serino-proteases é ativada quando diferentes receptores reconhecem modelos moleculares (John *et al.*, 2010).

Na figura 4 temos uma sumarização do que se e conhecido hoje dos componentes envolvidos no sistema imune inato em aranhas e provavelmente em todos os aracnídeos.

Peptídeos antimicrobianos

Muitas proteínas e peptídeos, induzíveis ou constitutivos, com atividade contra diferentes tipos de microrganismos, foram encontrados em quase todos os grupos de animais. Uma considerável variedade de peptídeos, apresentando diferentes estruturas está associada à atividade antimicrobiana em eucariotos. A classificação mais atual considera a estrutura terciária: 1) proteínas e peptídeos lineares (randômicos) ricos em um ou mais tipos de aminoácidos, principalmente prolina ou glicina; 2) proteínas e peptídeos lineares que não possuem resíduos de cisteínas em sua sequência e que formam alfa-hélice; 3) proteínas e peptídeos cíclicos (com cisteínas em sua sequência) apresentando estruturas alfa-hélice e folha beta pregueada (Andreu & Rivas 1998; Bulet 1999). Considerando que recentemente foram isolados e caracterizados peptídeos com cisteína que apresentam uma estrutura cíclica com terminação fechada (Tang *et al.* 1999) será necessário fazer alterações à classificação feita por Andreu y Rivas (1998) e Bulet (1999) apresentada acima.

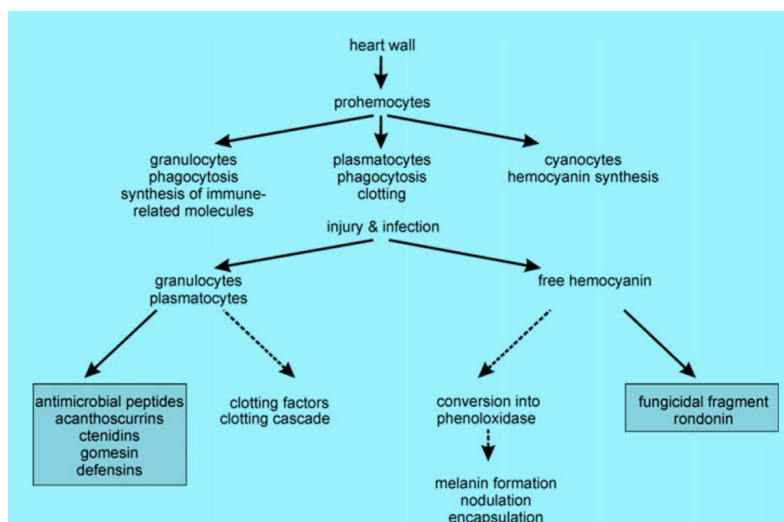


Figura 4 – Esquema do sistema imune de aranhas: origem e função dos hemócitos (parte superior) e reação a uma injúria e infecção por invasão microbiana (parte inferior). A reação das aranhas a uma injúria e infecção ainda não está bem investigada e somente os componentes assinalados já foram detectados nos hemócitos ou na hemolinfa de aranhas, enquanto as vias envolvidas na cascata de coagulação e formação de melanina foram observadas nos limulídeos (Kuhn-Nentwig e Nentwig, 2013).

Os peptídeos antimicrobianos são tipicamente moléculas anfipáticas positivamente carregadas compostas de 12 a 45 resíduos de aminoácidos. O principal modo de ação destas moléculas é através do aumento da permeabilidade da membrana plasmática (Andreu y Rivas 1998; Hancock y Lehrer 1998). Uma correlação direta entre o efeito antibiótico e a habilidade de permeabilização foi encontrado para defensinas, magaininas, cecropinas, battenecinas e dermaseptinas, entre outras (Andreu y Rivas 1998). A primeira etapa no mecanismo de ação seria a interação eletrostática entre o peptídeo positivamente carregado e os componentes negativamente carregados da membrana do microrganismo e/ou parasita. Em uma etapa posterior, a interação entre a porção apolar da membrana das células e os resíduos hidrofóbicos das proteínas e peptídeos antimicrobianos culminariam na permeabilização das membranas.

Embora a maioria das proteínas e peptídeos antimicrobianos descritos sejam fortemente positivos, foram descritos alguns peptídeos antimicrobianos negativamente carregados muito ativos e, provavelmente nestes casos, um modo diferente de ação possa estar envolvido (Andreu y Rivas 1998).

Peptídeos antimicrobianos estão amplamente distribuídos nos organismos. A ampla ocorrência dessas substâncias sugere que elas desempenham um papel importante na imunidade inata contra microrganismos e outros patógenos (Boman 1995; Ganz y Lehrer 1999; Hoffmann *et al.* 1999). Nos artrópodes, as proteínas e os peptídeos antimicrobianos têm sido estudados principalmente em insetos, crustáceos e limulídeos. Nos insetos, os genes codificadores das

proteínas e peptídeos antimicrobianos são induzidos por infecção e após algumas horas essas macromoléculas são secretadas no plasma (Hoffmann *et al.* 1996; Engström 1998; Manetti *et al.* 1998). Já em alguns crustáceos tais como o camarão *Penaeus vannamei* (Destoumieux *et al.* 2000), as proteínas e peptídeos antimicrobianos são sintetizados constitutivamente e ficam armazenados nos grânulos dos hemócitos. Nestes, a presença de organismos invasores induz a liberação destas moléculas para o plasma.

Nos últimos 20 anos, diversos desses peptídeos antimicrobianos foram isolados e caracterizados em invertebrados incluindo representantes de duas classes de quelicerados: limúldeos (merostomata) (Iwanaga *et al.*, 1998), escorpiões (arachnida) (Cociancich *et al.* 1993; Ehret-Sabatier *et al.* 1996) e carrapatos (arachnida) (Johns *et al.* 1998; Fogaça *et al.* 1999). Os hemócitos dos limúldeos contêm vários peptídeos positivamente carregados ricos em cisteína (taquiplesina, polifemusina, taquicitina, taquistatina e "big-defensina") com efeitos inibitórios sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos. As taquiplesinas e polifemusinas estão localizadas em pequenos grânulos nos hemócitos, onde estão também as taquicitinas e as taquistatinas, enquanto que os fatores anti-LPS e D são encontrados nos grânulos grandes e a "big-defensina" em ambos os tipos de grânulos (Iwanaga *et al.*, 1998). Além deste grupo de quelicerados, diversas proteínas e peptídeos antimicrobianos foram caracterizados na hemolinfa dos escorpiões. Foi caracterizado na hemolinfa dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus*, não submetidos a desafio bacteriano, uma molécula semelhante as defensinas de insetos e com atividade contra bactérias Gram-positivas (Cociancich *et al.*, 1993). Em *Androctonus australis*, também não submetidos a desafio bacteriano, três distintos peptídeos antimicrobianos foram caracterizados na hemolinfa: androctonina, butinina e uma defensina (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). A defensina é semelhante a defensina encontrada em *L. quinquestriatus*. Androctonina é um peptídeo com 25-resíduos de aminoácidos e quatro resíduos de cisteína, ativo contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Androctonina mostra similaridade na seqüência com taquiplesinas e polifemusinas. O outro peptídeo, a butinina, apresenta 34 resíduos de aminoácidos com três pontes dissulfeto, não mostrando similaridade com qualquer seqüência conhecida de peptídeos antimicrobianos. Enquanto que a defensina e a androctonina são ativas contra fungos e bactérias, a butinina apresenta somente atividade antibacteriana.

Em carrapatos foram isolados dois fatores antibacterianos da hemolinfa de *Dermacentor variabilis* que apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas. A concentração desses fatores é aumentada por infecção bacteriana. Um desses fatores apresenta massa de 14,5 kDa e apresenta semelhanças com lisozima (Johns *et al.*, 1998).

No carrapato do boi *Boophilus microplus* foi detectada atividade antibacteriana e antifúngica na hemolinfa e no conteúdo intestinal de animais não desafiados por infecção bacteriana. No plasma foi identificado um fator antibacteriano com 10 kDa de massa molecular sem similaridade na sua seqüência N-terminal com outras moléculas antimicrobianas. Um dos fatores responsáveis por essa atividade no conteúdo intestinal é um peptídeo com massa molecular de 3,2 kDa e seu sequenciamento revelou que se tratava do fragmento 33-61 da cadeia

α da hemoglobina bovina (Fogaça *et al.* 1999). Esse fragmento com atividade antimicrobiana parece ser gerado no intestino dos carrapatos por clivagem enzimática da hemoglobina bovina. Como durante a alimentação sanguínea esses animais ficam susceptíveis a infecções pelas bactérias presentes no couro do bovino e/ou que infectem o animal, a clivagem da hemoglobina gerando fragmentos com atividade antimicrobiana torna-se importante para a proteção dos carrapatos.

Embora existam muitos trabalhos sobre a resposta imunológica em artrópodes, eles estão praticamente restritos aos insetos, crustáceos e limulídeos. Poucos são os estudos com aracnídeos (Silva *et al.* 2000; Lorenzini *et al.* 2003; Baumann *et al.* 2010a, b). Nos últimos anos temos estudado principalmente os peptídeos antimicrobianos em aracnídeos. No plasma de aranhas caranguejeiras do gênero *Acanthoscurria* encontramos dois peptídeos “*Theraphosinina*” (*A. gomesiana*) e “*Rondonina*” (*A. rondoniae*). *Theraphosinina*, um peptídeo de 4052,5 Da que apresenta atividade contra *Micrococcus luteus* e sem similaridade com outros peptídeos conhecidos. *Rondonina* um peptídeo com 1236,5 Da com atividade antifúngica que além de estar presente no plasma de *A. rondoniae* também foi observado no plasma de outros theraphosídeos como *A. gomesiana*, *Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovilosum*, *Lasiodora parahybana*. A sequência de aminoácidos deste pequeno peptídeo (IIIQYEGHKH) corresponde ao fragmento C-terminal da subunidade ‘d’ da hemocianina identificada a partir de *Acanthoscurria gomesiana* and *Aphonopelma hentzi* (Riciluca *et al.* 2012).

Nos hemócitos da aranha *A. gomesiana* isolamos e caracterizamos dois peptídeos. A gomesina e um pequeno peptídeo cíclico de terminação aberta composto por 18 aminoácidos (2,3 kDa) isolado de hemócitos de *Acanthoscurria gomesiana* (Silva *et al.* 2000). Esse peptídeo forma duas pontes dissulfeto internas e adota uma conformação “beta-hairpin”, lembrando peptídeos antimicrobianos de outros aracnídeos (tachyplesina e polyphemusina de limulídeos e, androctonina de escorpiões). Gomesina é expresso constitutivamente e, estocado nos grânulos e liberados na hemolinfa após uma estimulação por lipopolissacarídeos (Fukuzawa *et al.* 2008). Gomesina apresenta amplo espectro de atividade contra bactéria, fungos e também contra células eucarióticas, *Leishmania amazonensis* ou hemáceas humanas (Silva *et al.* 2000). O outro peptídeo encontrado nos hemócitos, a acanthoscurrina, um peptídeo rico em glicina, que apresenta duas isoformas com 10132,4 e 10249,1 Da. Este peptídeo tem atividade contra *Escherichia coli* e *Candida albicans* e apresenta grande similaridade com proteínas antifúngicas de insetos e também com proteínas relacionadas com a defesa em plantas. Acanthoscurrinas são constitutivamente expressas nos hemócitos, estocadas em seus grânulos e liberadas na hemolinfa no momento de uma infecção (Lorenzini *et al.* 2003; Fukuzawa *et al.* 2008).

Em *Cupiennius salei* três isoformas foram isoladas, as quais apresentam atividade contra as bactérias Gram-negativa *E. coli*, mas não contra a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* nem contra *Candida albicans*. Ensaios mostraram que esses peptídeos constitutivamente expressos nos hemócitos e são bacteriostáticos (Baumann *et al.* 2010b).

Moléculas similares a gomesiana e acanthoscurrina também foram observadas nas aranhas caranguejeiras *A. rondoniae*, *Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovilosum*, *Lasiodora parahybana*, *Grammostola pulchra*, *Avicularia juruensis*, na araneomorphae *Phoneutria nigriventer*, além de *Heterophrynus longicornis* (Amblypygi) e *Mastigoproctus maximus* (thelyphonida).

Além dos peptídeos encontramos nos hemócitos de aracnídeos a Migalina, uma acilpoliamina isolada de hemócitos de aranhas migalomorfas e araneomorfas (Baumann 2009; Pereira *et al.* 2007). Esse composto foi identificado como um bis-acilpoliamina com uma massa molecular de 417Da. Migalina é ativa contra bactérias Gram-negativas. Essa molécula tem sua atividade inibida por catalase o que pode indicar que em seu mecanismo de ação pode estar envolvido a produção de peróxido de hidrogênio. A migalina também é encontrada *A. rondoniae*, *Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovilosum*, *Lasiodora parahybana*, *Grammostola pulchra*, *Avicularia juruensis*, na araneomorphae *Phoneutria nigriventer*, e em *Cupiennius salei* (Kuhn-Nentwig e Nentwig 2013) além de *Heterophrynus longicornis* (Amblypygi) e *Mastigoproctus maximus* (thelyphonida).

Nosso grupo também isolou da hemolinfa de Opilião (*Acustisoma longipes*) um peptídeo antimicrobiano linear constituído de 18 aminoácidos, denominado longipina. Esse peptídeo foi sintetizado, apresentando atividade contra bactérias (Gram-positivas e negativas) e leveduras. Não foram encontrados similares desse peptídeo em outros organismos (Sayegh 2011).

Foram encontrados nas araneomorfas as defensinas, peptídeos pequenos, anfipáticos e ricos em cisteína que são formados por 37 resíduos de aminoácidos. Esses peptídeos exibem seis conservadas cisteínas seguindo um arranjo comum as defensinas de artrópodes (C1–C4, C2–C5, C3–C6), que as caracterizam como membros de uma grupo ancestral de defensinas de invertebrados (Froy and Gurewitz 2003). Defensinas apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas. Esses peptídeos são conhecidos em diversos grupos de aranhas araneomorfas: Araneidae (*Argiope* sp.), Tetragnathidae (*Meta menardi*), Agelenidae (*Tegenaria atrica*), Sparassidae (*Polybetes pythagoricus*), and Ctenidae (*Cupiennius salei* e *Phoneutria reydya*). Em *C. salei*, as defensinas são constitutivamente expressas não somente nos hemócitos, mas também em vários tecidos. Análises de uma biblioteca de cDNA de hemócitos do terafosídeo *Acanthoscurria gomesiana* (Lorenzini *et al.* 2006), até o momento nenhuma defensina foi encontrada nas aranhas migalomorfas.

Referências bibliográficas

- ANDREU, D.; RIVAS, L. 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47 (6): 415-433.
- BARRAVIERA, B. 1994. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro, RJ: Editora de Publicações Biomédicas 411 p.
- BAUMANN, T. 2009. Immune defence of *Cupiennius salei*. Ph.D. thesis, University of Bern

- BAUMANN, T.; KAMPFER, U.; SCHURCH, S.; SCHALLER, J.; LARGIADER, C.; NENTWIG, W.; KUHN-NENTWIG, L. 2010a. Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. *Cell. Mol. Life Sci* 67: 2787-2798.
- BAUMANN, T.; KUHN-NENTWIG, L.; LARGIADER, C.; NENTWIG, W. 2010b. Expression of defensins in noninfected araneomorph spiders. *Cell. Mol. Life Sci* 67: 2643-2651.
- BOMAN, H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61-92.
- BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCO, J. L.; HOFFMANN, D. 1999. Antimicrobial Peptides in Insects; Structure and Function. *Dev. Comp. Immunol.* 23 (4-5) : 329-44.
- BURMESTER, T. 2002. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp Physiol B* 172:95-107. doi:10.1007/s00360-001-0247-7
- BURMESTER, T. 2013. Evolution and adaptation of hemocyanin within spiders. In: Nentwig W (ed) *Spider ecophysiology*. Springer, Heidelberg.
- COCIANCICH, S.; GOYFFON, M.; BONTEMS, F.; BULET, P.; BOUET, F.; MÉNEZ, A.; HOFFMAN, J. 1993. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 42kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 194 (1):1 7-22.
- DECKER, H.; RIMKE, T. 1998. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J Biol Chem* 273: 25889-25892
- DECKER, H.; TUCZEK, F. 2000. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci* 25: 392-397.
- DESTOUMIEUX, D.; MUÑOZ, M.; COSSEAU, C.; RODRIGUEZ, J.; BULET, P.; COMPS, M.; BACHÈRE, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci.*, 113 (Pt 3): 461-469.
- EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, J. A.; VAN DORSSELAER, A.; BULET, P. 1996. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.* 47 (504): 29537-20544.
- ENGSTROM, Y. 1998 insect immune gene regulation. pp. 211-244. In: *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects* (ed. P.T. Brey and D. Hultmark). London: Chapman & Hall.
- FROY, O.; GUREWITZ, M. 2003. Arthropod and mollusk defensins-evolution by exon-shuffling. *Trends Gen* 19: 684-687.
- FUKUZAWA, A. H.; VELLUTINI, B. C.; LORENZINI, D. M.; SILVA, P. I. JR; MORTARA, R. A.; DA SILVA J. M. C.; DAFFRE, S. 2008. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev Comp Immunol* 32: 716-725.
- GANZ, T.; LEHRER, R. I. 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today* 5: 2 92-297.
- HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. 1999. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* 284: 1313-1318.
- HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M.; HETRU, C. 1996. Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 8-13.
- IWANAGA, S.; LEE, B. L. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 128-50.
- JAENICKE, E.; DECKER, H. 2004. Functional changes in the family of type 3 copper proteins during evolution. *Chembiochem* 5: 163-169. doi:10.1002/cbic.200300714.

- KAWABATA, S. 2010. Immunocompetent molecules and their response network in horseshoe crabs. *Adv Exp Med Biol* 708: 122-136.
- KAWABATA, S., OSAKI, T., IWANAGA, S. 2002. Innate immunity in the horseshoe crab. In: Ezekowitz.
- EZEKOWITZ, R. A. B.; HOFFMANN, J. A. (Eds.) 2003. Infectious disease: innate immunity. Humana, New York., pp 287-303. 410 p.
- IWANAGA, S.; KAWABATA, S. I.; UTA, T. 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in Horseshoe Crab hemolymph: Their structures and functions. *J. Biochem.* 123: 1-15.
- JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. 1998. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J. Med. Entomol.* 35 (4): 458-464F.
- KEMPER, B. 1983 Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Euryplema californicum*. *Naturwissenschaften* 70: 255-256.
- KROPF, C. 2013 Hydraulic system of locomotion. In: Nentwig W (ed) *Spider ecophysiology*. Springer, Heidelberg .
- KUHN-NENTWIG, L.; LARGIADER, C. R.; STREITBERGER, K.; CHANDRU, S.; BAUMANN, T.; KAMPFER, U.; SCHALLER, J.; SCHURCH, S.; NENTWIG, W. 2011. Purification, cDNA structure and biological significance of a single insulin-like growth factor-binding domain protein (SIBD-1) identified in the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41: 891-901.
- LORENZINI, D. M.; DA SILVA, P. I., FOGAÇA, A. C., BULET, P., DAFFRE, S. 2003. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 781-791.
- LORENZINI, D. M.; DA SILVA, P. I. JR; SOARES, M. B.; ARRUDA, P.; SETUBAL, J.; DAFFRE, S. 2006. Discovery of immune-related genes expressed in hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev Comp Immunol* 30: 545-556.
- MAFRA, D. G.; DA SILVA, P. I. JR; GALHARDO, C. S.; NASSAR, R.; DAFFRE, S.; SATO, M. N.; BORGES, M. M. 2012. The spider acylpolyamine mygalin is a potent modulator of innate immune responses. *Cell Immunol.* 275: 5-11.
- MANETTI, A. G. O.; ROSETO, M.; MARCHINI, M. 1998 Antibacterial peptides of the insect reproductive tract. pp. 67-91. In: *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects* (ed. P.T. Brey and D. Hultmark), London: Chapman & Hall.
- MATSUDA, Y.; OSAKI, T.; HASHII, T.; KOSHIBA, T.; KAWABATA, S. 2007. A cysteine-rich protein from an arthropod stabilizes clotting mesh and immobilizes bacteria at injury sites. *J. Biol. Chem.* 282: 33545-33552.
- MILLOT, J. 1949. Appareil circulatoire. In: Grasse, P. (ed). *Traite' de Zoologie*, vol VI. Masson, Paris, pp. 639-646.
- NAGAI, T.; KAWABATA, S. 2000. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J. Biol. Chem.* 275: 29264-29267.
- NAGAI, T.; OSAKI, T.; KAWABATA, S. 2001. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 276: 27166-27170.
- NENTWIG, W. 2012. The species referred to as *Euryplema californicum* (Theraphosidae) in more than 100 publications is likely to be *Aphonopelma hentzi*. *J. Arachnol.* 40: 128-130.

- NENTWIG, L. K.; NENTWIG, W. 2013. The Immune System of Spider. In: Nentwig, W. Spider Ecophysiology. Bern: Springer p. 82.
- OSAKI, T.; KAWABATA, S. 2004. Structure and function of coagulogen, a clottable protein in horseshoe crabs. *Cell Mol Life Sci* 61: 1257-1265.
- PEREIRA, L. S.; SILVA, P. I. JR; MIRANDA, M. T.; ALMEIDA, I. C.; NAOKI, H.; KONNO, K.; DAFFRE, S. 2007. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352: 953-959.
- RICILUCA, K. C. T.; SAYEGH, R. S. R.; MELO, R. L.; SILVA, P. I. Jr 2012. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Res. Immunol.* 2: 66-71.
- RODRIGUES, E. G.; DOBROFF, A. S.; CAVARSAN, C. F.; PASCHOALIN, T.; NIMRICHTER, L.; MORTARA, R. A.; SANTOS, EL.; FAZIO, M. A.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; TRAVASSOS, L. R. 2008. Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin. *Neoplasia* 10:61-68.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. 2005. Zoologia dos invertebrados. 6 th ed. [S. l.] : Saunders College Publishing.
- SAYEGH, R. S. R. 2011. Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae; Opiliones). Dissertação apresentada para o programa de pós-graduação interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.
- SEITZ, K. A. 1972. Zur Histologie und Feinstruktur des Herzens und der Haemocytan von *Cupiennius salei* Keys. (Araneae, Ctenidae). *Zool. Jb. Anat.* 89: 351-384.
- SEITZ, K. A. 1976 Zur Feinstruktur der Hautungshamocyten von *Cupiennius salei* Keys (Araneae, Ctenidae). *Zool Jb Anat* 96:280-292.
- SHERMAN, R. G. 1973. Ultrastructurally different hemocytes in a spider. *Can J Zool* 51:1155-1159.
- SHERMAN, R. G. 1981. Chelicerates. In: Ratcliffe, N. A.; Rowley, A. F. (Eds.). *Invertebrate blood cells*, vol 2. Academic, London.
- SILVA, P. I. Jr; DAFFRE, S.; BULET, P. 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem* 275: 33464-33470.
- SOARES, T.; FERREIRA, F. R. B.; GOMES, F. S.; COELHO, L. C. B. B.; TORQUATO, R. J. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CAVALCANTI, M. S. M.; TANAKA, A. S.; PAIVA, P. M. G. 2011. The first serine protease inhibitor from *Lasiodora* sp. (Araneae: Theraphosidae) hemocytes. *Prog. Biochem.* 46: 2317-2321.
- SODERHALL, K.; CERENIUS, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 23-28.
- SOLETTI, R. C.; del BARRIO, L.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A.; BORGES, H. L.; MOURA-NETO, V.; LOPEZ, M. G.; GABILAN, N. H. 2010. Peptide gomesin triggers cell death through L-type channel calcium influx, MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling and generation of reactive oxygen species. *Chem. Biol. Interact.* 186: 135-143.
- TANG, Y. Q.; YUAN, J.; OSAPAU, G.; OSAPAY, G.; TRAN, D.; MILLER, C. J.; OUELLETTE, A. J.; SELSTED, M. E. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 1999 Oct 15; 286 (5439): 498-502.

- TRACHSEL, C.; WIDMER, C.; KAMPFER, U.; BUHR, C.; BAUMANN, T.; KUHN-NENTWIG, L.; SCHURCH, S.; SCHALLER, J.; BAUMANN, U. 2012. Structural and biochemical characterization of native and recombinant single insulin-like growth factor-binding domain protein (SIBD-1) from the Central American hunting spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Proteins* 80: 2323-2329.
- WIRKNER, C.; HUCKSTORF, K. 2013. The circulatory system of spiders. In: Nentwig, W. (ed.) *Spider ecophysiology*. Springer, Heidelberg.